

11813
-EP

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 753 903**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **97 12384**

(51) Int Cl⁹ : A 61 K 31/715, A 61 K 7/48

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 26.09.97.

(30) Priorité : 26.09.96 FR 9611976.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 03.04.98 Bulletin 98/14.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : CODIF INTERNATIONAL SA
SOCIÉTÉ ANONYME — FR.

(72) Inventeur(s) : GEDOUIN JEAN et VALLEE
ROMUALD.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET LE GUEN ET MAILLET.

(54) PROCÉDE D'ELABORATION D'UN PRODUIT NOTAMMENT DESTINE A PREVENIR ET A SOIGNER DES
MALADIES DE LA PEAU, ET UN TEL PRODUIT.

(57) La présente invention concerne un procédé d'élabora-
tion d'un produit notamment destiné à prévenir et à soigner
des maladies de la peau, et un tel produit;

Ledit procédé d'élaboration selon l'invention consiste à
utiliser un extrait naturel d'alginate de sodium et à soumet-
tre ledit extrait à au moins un traitement de dépolymérisa-
tion;

Un tel produit selon l'invention comprend des enchaîne-
ments d'oligo-alginates et d'acides uroniques;

L'invention s'applique notamment à des éruptions cuta-
nées, des manifestations allergiques à des compositions
cosmétiques, et aux effets cutanés du vieillissement.

FR 2 753 903 - A1



La présente invention concerne un procédé d'élaboration d'un produit notamment destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau, telles que des éruptions cutanées ou des manifestations allergiques à des compositions cosmétiques, et un tel produit. L'invention concerne également un produit destiné à lutter contre les effets cutanés du vieillissement, que ce dernier soit naturel, dû à la pollution ou résultant d'expositions aux rayonnements ultraviolets.

Les travaux de Susuma Tonegawa, Prix Nobel de médecine en 1987, ont mis en évidence la fonction immunologique de certaines cellules de l'épiderme, les cellules de Langerhans, vis-à-vis des agressions localisées dans la couche épidermique de la peau. Les cellules de Langerhans, qui appartiennent à une famille de cellules dites dendritiques lymphoïdes, sont essentiellement situées dans les couches moyennes de l'épiderme. Malgré leur faible densité, elles ont un rôle d'information et de surveillance sur l'ensemble de l'épiderme, grâce à leur nature dendritique et à leur capacité migratoire, notamment.

Les cellules de Langerhans sont capables à la fois de phagocyter les corps étrangers ou les allergènes ayant pénétré dans l'épiderme et de transmettre des antigènes à des cellules immuno-compétentes particulières, les cellules dites cellules T. L'activation et la protection des cellules de Langerhans permettent donc de stimuler le processus de défense intrinsèque de l'épiderme.

Or, on sait que ces cellules sont directement exposées aux rayonnements ultraviolets résultant d'une exposition au soleil. Des études récentes ont montré que ces rayonnements provoquent à plus ou moins grande échelle, d'une part, une diminution des marqueurs de membrane et donc une altération de la capacité de présentation d'antigènes aux cellules immuno-compétentes et, d'autre part, une disparition des dendrites caractérisant les cellules de Langerhans. En cas d'exposition prolongée au soleil, les rayonnements ultraviolets inhibent les cellules de Langerhans et ces dernières voient leur nombre diminuer.

On a cherché à élaborer des produits susceptibles de protéger et d'activer les cellules de Langerhans en prévision des rayonnements ultraviolets qui agissent fréquemment sur l'épiderme.

On connaît ainsi de tels produits qui sont élaborés à partir d'extraits de membranes de levures, et qui sont constitués de polysaccharides d'origine végétale. On peut par exemple citer des produits appartenant à la famille des β - 1, 3 glucanes, reconnus par les récepteurs membranaires des cellules de Langerhans, et qui

permettent auxdites cellules de maintenir dans une certaine mesure leur activité macrophage et de protéger les cellules immuno-compétentes de l'épiderme.

Un inconvénient majeur des produits précités réside dans leur pénétration souvent insuffisante dans l'épiderme, laquelle est due à la taille importante des
5 molécules de polysaccharides constituant lesdits produits.

Le but de la présente invention est de proposer un procédé d'élaboration d'un produit notamment destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau et un tel produit, qui soit tel que ledit produit puisse pénétrer de manière satisfaisante dans l'épiderme et donc présenter une bonne activité protectrice de la peau vis-à-vis des
10 agressions extérieures.

A cet effet, un procédé d'élaboration d'un tel produit est tel qu'il consiste à utiliser un extrait naturel d'alginate de sodium et à soumettre ledit extrait à au moins un traitement de dépolymérisation.

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'on soumet ledit extrait à un
15 traitement de dépolymérisation enzymatique au moyen d'une alginate lyase.

De préférence et ultérieurement audit traitement enzymatique, l'on soumet ledit extrait dépolymérisé à une hydrolyse en milieu acide.

Un produit selon l'invention destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau est tel qu'il comprend des enchaînements d'oligo-alginates et d'acides uroniques.

De préférence, il comprend en outre au moins un oligoélément sous forme
20 cationique formant un chélate avec lesdits enchaînements.

Ledit chélate comprend par exemple des ions Zn^{2+} , ou un ensemble d'ions Mn^{2+} et Mg^{2+} .

Selon une variante de réalisation de l'invention, ledit produit comprend en
25 outre des extraits naturels d'algues du type *chlorella*.

Un produit selon l'invention est prévu pour protéger des rayonnements ultraviolets les cellules de Langerhans de l'épiderme.

Il est également prévu pour augmenter la concentration épidermique de l'interleukine 1α :

Un produit selon l'invention du type comprenant ledit chélate est prévu pour
30 présenter un effet anti-radicalaire vis-à-vis des radicaux libres produits par des rayonnements ultraviolets.

Plus précisément, ledit produit est alors prévu pour protéger les cellules du derme de l'oxydation des protéines, et de la fragmentation de l'ADN.

Ledit produit comprenant ledit chélate est également prévu pour présenter un effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité de l'enzyme 5 α réductase.

Ledit produit comprenant ledit chélate est également prévu pour présenter un effet inhibiteur vis-à-vis de la souche bactérienne pathogène *Propionibacterium acnes*.

Les caractéristiques de l'invention mentionnées ci-dessus, ainsi que d'autres, apparaîtront plus clairement à la lecture de la description suivante de plusieurs exemples de réalisation.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, un produit selon l'invention est constitué d'oligosaccharides du type comprenant, d'une part, des oligo-alginates et, d'autre part, des acides présentant une structure analogue à celle des acides alpha-hydroxylés, tels que des acides uroniques.

Ledit produit est élaboré à partir d'un extrait d'algues, de préférence de l'espèce *Laminaria digitata*, qui sont à base de polysaccharides constitués d'un alginat de sodium. Un procédé d'élaboration dudit produit est le suivant.

On soumet dans un premier temps ledit extrait d'alginate de sodium à une réaction de dépolymérisation enzymatique. On utilise à cet effet une enzyme du type mannuronate lyase, de préférence une alginat lyase. Cette enzyme, obtenue par fermentation bactérienne, permet de dépolymériser par β -élimination les blocs alternés de la molécule d'alginate de sodium, qui sont constitués d'enchaînements d' α -L-guluronate de sodium et de β -D-mannuronate de sodium liés en 1, 4. De plus, l'enzyme précitée permet de réduire très rapidement la viscosité de la solution d'alginate de sodium au terme de ladite étape de dépolymérisation.

De préférence, on soumet ensuite l'extrait d'alginate dépolymérisé à une hydrolyse partielle en milieu acide, de manière à obtenir un produit caractérisé par un degré de polymérisation encore réduit par rapport à celui dudit extrait dépolymérisé.

On notera que cette hydrolyse est grandement facilitée par la mise en oeuvre de ladite première étape, de par la viscosité réduite de l'extrait d'alginate traité par ladite enzyme et grâce à la dépolymérisation préalable desdits blocs caractérisant l'alginate de sodium.

Par ailleurs, il est à noter que ladite enzyme permet de limiter la gélification de l'acide alginique suite à l'acidification, ce qui permet de conférer une bonne activité au produit obtenu.

A titre simplement indicatif, on trouvera ci-dessous deux exemples de préparation du produit selon l'invention.

5

Exemple 1:

L'extrait d'algue constitué d'alginate de sodium est d'abord solubilisé pendant une heure à une concentration de 5 %.

10 L'extrait d'alginate solubilisé est ensuite soumis à une dépolymérisation enzymatique à une température de 25° C et pendant quatre heures, au moyen d'une alginate lyase connue sous la dénomination AL 951. De plus, le ratio massique enzyme/alginate est de 0,01 % et le pH du milieu est de 7,5.

15 Les masses moléculaires moyennes en nombre dudit extrait solubilisé sont déterminées pendant et après ladite dépolymérisation enzymatique, par la méthode dite du "dosage des doubles liaisons conjuguées" (voir annexe I).

On en déduit le degré de polymérisation moyen en nombre dudit extrait aux deux moments précités.

Dans cet exemple de réalisation, ledit degré de polymérisation de l'extrait d'alginate est de 96 suite au traitement enzymatique.

20 Cet extrait d'alginate de degré de polymérisation égal à 96 peut constituer un produit selon l'invention, qui est prévu pour présenter une action sur la peau essentiellement en surface de celle-ci.

25 De préférence, on hydrolyse ensuite partiellement et en milieu acide l'extrait dépolymérisé, l'hydrolyse étant conduite pendant quatre heures à un pH de 1,5 et à 94° C. A cet effet, on ajoute de l'acide sulfurique audit extrait, le ratio acide/alginate étant de 30 % en poids sec. La réaction est stoppée par refroidissement jusqu'à ce que la température du milieu atteigne 20° C, ce qui est le cas au bout d'une heure.

30 On détermine alors la masse moléculaire moyenne en nombre de l'extrait hydrolysé par la méthode de SOMOGYI-NELSON dite du "dosage des sucres réducteurs" (voir annexe II), et l'on en déduit le degré de polymérisation moyen en nombre du produit finalement obtenu.

Dans cet exemple de réalisation, ledit degré de polymérisation du produit selon l'invention est de 12.

Exemple 2:

5 De même que précédemment, l'extrait d'alginate de sodium est d'abord solubilisé pendant une heure à une concentration de 5 %.

L'extrait solubilisé est ensuite soumis à une dépolymérisation enzymatique à une température de 25° C et pendant vingt-trois heures, au moyen de ladite alginate lyase. De plus, le ratio massique enzyme/alginate est de 0,1 % et le pH du milieu est
10 maintenu à 7,5.

Suite au traitement enzymatique, le degré de polymérisation moyen en nombre est déterminé comme indiqué dans l'exemple 1.

Dans cet exemple de réalisation, ledit degré de polymérisation de l'extrait traité par l'alginate lyase est de 9.

15 On soumet ensuite ledit extrait traité à une hydrolyse acide dans les mêmes conditions qu'à l'exemple précédent, et l'on détermine de la même manière le degré de polymérisation moyen en nombre du produit finalement obtenu.

Dans cet exemple de réalisation, le produit selon l'invention est caractérisé par un degré de polymérisation égal à 4.

20 On notera que les degrés de polymérisation réduits qui ont été finalement obtenus dans lesdits exemples de réalisation favorisent la pénétration cutanée du produit selon l'invention, pour son action en profondeur dans le *stratum corneum*, notamment.

25 On notera encore que l'hydrolyse en milieu acide constitue une étape facultative du procédé selon l'invention. En effet, l'on pourrait se contenter de procéder à la seule dépolymérisation enzymatique, du moment que le degré de polymérisation du produit obtenu suite au traitement à l'alginate lyase serait tel que la pénétration dudit produit dans la peau serait satisfaisante. A titre indicatif, la valeur
30 maximale admissible du degré de polymérisation du produit selon l'invention est environ de 20 pour présenter ladite action, en profondeur.

On notera en outre qu'un produit selon ce premier mode de réalisation de l'invention présente une stabilité dans le temps satisfaisante, d'après les tests chromatographiques dont il a fait l'objet.

Afin de mettre en évidence l'effet immuno-modulateur sur l'épiderme d'un produit selon ce premier mode de réalisation de l'invention, on a procédé à des expériences consistant, après avoir soumis des explants de peau à une irradiation aux rayons ultraviolets de classe B (U. V. B.), à visualiser et à compter les cellules de Langerhans présentes dans l'épiderme, à l'aide d'un microscope à fluorescence.

On trouvera ci-dessous un compte-rendu détaillant le mode opératoire et les résultats se rapportant à ces expériences, ceci pour trois produits différents correspondant à la première variante de réalisation de l'invention.

Chacun desdits produits est caractérisé par une même fraction volumique d'oligosaccharides égale à 0,25 %, et les pH desdits produits sont respectivement de 2, 4 et 7. Ces produits seront respectivement désignés sous le nom d'ALGpH2, ALGpH4 et ALGpH7 dans la suite de la description.

Des échantillons d'explants de peau d'un sujet sain, obtenus suite à une intervention de chirurgie plastique abdominale, sont placés en survie dans un milieu de culture approprié. Quatre séries d'explants sont préparées:

- la première série (témoin) est telle que chaque explant la constituant ne reçoit pas le produit selon l'invention et n'est pas soumis à une irradiation U. V. B.
- la deuxième série (témoin irradié) est telle que chaque explant la constituant ne reçoit pas le produit selon l'invention mais est soumis à une irradiation U. V. B.
- la troisième série (traité et non irradié) est telle que chaque explant la constituant reçoit le produit selon l'invention mais n'est pas soumis à une irradiation U. V. B.
- la quatrième série (traité et irradié) est telle que chaque explant la constituant reçoit le produit selon l'invention et est soumis à une irradiation U. V. B.

Les quatre séries d'explants sont congelées par immersion dans de l'isopentane qui est refroidi à -55° C dans de l'azote liquide.

On effectue par la suite plusieurs coupes frontales à l'intérieur d'un cryostat à une température de -16° C, ce qui a pour effet de stopper l'activité immunitaire des cellules de Langerhans.

On procède ensuite à l'incubation d'un anticorps primaire et d'un anticorps secondaire dans chaque explant, lesquels anticorps permettent de révéler, par la technique d'immunofluorescence, l'activité des cellules de Langerhans. En effet, les

cellules de Langerhans ne sont actives que si elles jouent leur rôle antigénique en bloquant les anticorps, ladite action antigénique étant observable au microscope à fluorescence.

L'anticorps primaire est prévu pour reconnaître les cellules de Langerhans et l'anticorps secondaire, couplé à des molécules fluorescentes de tétraméthyl-rhodamine-isothiocyanate (TRITC), est prévu pour colorer lesdites cellules.

On observe les échantillons coupés et incubés au microscope à fluorescence, afin de pouvoir visualiser et dénombrer les cellules de Langerhans caractérisant chaque échantillon.

Les échantillons ont été photographiés et étudiés pour chaque série d'explants, de manière à pouvoir évaluer le nombre moyen de cellules de Langerhans par unité de longueur d'épiderme pour l'ensemble des échantillons observés. On a également fait figurer pour chaque série étudiée l'erreur standard moyenne (SEM), laquelle est obtenue en divisant l'écart-type mesuré par la racine carrée du nombre d'échantillons de la série concernée. Le nombre total d'échantillons étant important, deux catégories de mesures ont été effectuées, la première catégorie étant destinée à déterminer l'effet immuno-modulateur des produits ALGpH2 et ALGpH7, alors que la seconde catégorie est destinée à déterminer l'effet immuno-modulateur du troisième produit ALGpH4 selon l'invention.

L'effet immuno-modulateur de chaque produit a été chiffré au moyen de la relation suivante:

$$E. I. (\%) = \frac{\Delta N(\text{témoin-témoin irradié}) - \Delta N(\text{traité-traité irradié})}{\Delta N(\text{témoin-témoin irradié})} \times 100$$

où E. I. représente la valeur en pourcentage dudit effet immuno-modulateur,

$\Delta N(\text{témoin-témoin irradié})$ représente le nombre de cellules de Langerhans de la série "témoin" diminué de celui de la série "témoin irradié", et

$\Delta N(\text{traité-traité irradié})$ représente le nombre de cellules de Langerhans de la série "traité" diminué de celui de la série "traité irradié".

La valeur trouvée pour E. I. permet de définir de manière qualitative et standardisée l'effet immuno-modulateur du produit testé. En particulier,

- Si $70\% < E. I. < 100\%$ alors le produit a un très bon effet immuno-modulateur.

- Si E. I. > 100 % alors le produit a un effet immuno-modulateur absolu.

Les tableaux I et II ci-dessous rendent compte de ces mesures.

5

Tableau I

| Série d'échantillons | Nombre moyen de cellules de Langerhans par cm d'épiderme \pm SEM | Variation et taux de variation du nombre de cellules de Langerhans par cm d'épiderme après irradiation | Effet immuno-modulateur |
|----------------------------------|--|--|-------------------------|
| témoin | 305 \pm 22 | -220 cellules | |
| témoin irradié | 85 \pm 13 | -72,1 % | |
| traité par ALGpH2 et non irradié | 276 \pm 55 | +113 cellules +40,9 % | 151,4 % |
| traité par ALGpH2 et irradié | 389 \pm 56 | | |
| traité par ALGpH7 et non irradié | 262 \pm 23 | -8 cellules -3,1 % | 96 % |
| traité par ALGpH7 et irradié | 254 \pm 31 | | |

Tableau II

10

| Série d'échantillons | Nombre moyen de cellules de Langerhans par cm d'épiderme \pm SEM | Variation et taux de variation du nombre de cellules de Langerhans par cm d'épiderme après irradiation | Effet immuno-modulateur |
|----------------------------------|--|--|-------------------------|
| témoin | 151 \pm 14 | -93 cellules | |
| témoin irradié | 58 \pm 7 | -61,6 % | |
| traité par ALGpH4 et non irradié | 303 \pm 18 | +23 cellules +7,6 % | 124,7 % |
| traité par ALGpH4 et irradié | 326 \pm 20 | | |

Il apparaît à la lecture des tableaux I et II que les produits ALGpH2 et ALGpH4 selon l'invention ont un effet immuno-modulateur absolu, c'est-à-dire qu'ils protègent totalement les cellules de Langerhans contenues dans l'épiderme, suite à l'irradiation de ce dernier aux rayons ultraviolets.

5 Il apparaît également que le produit selon l'invention ALGpH7 a un effet immuno-modulateur très important, en sorte qu'il permet d'obtenir une protection quasi-totale des cellules de Langerhans vis-à-vis des rayonnements ultraviolets.

Par conséquent, l'activité macrophage desdites cellules est préservée grâce au produit selon l'invention et la protection de l'épiderme vis-à-vis des agressions
10 extérieures est améliorée.

Dans une seconde expérience, on a confirmé l'effet de ALGpH4 à plusieurs doses. L'irradiation aux UVB a provoqué une diminution de 70 % du nombre de cellules de Langerhans par cm d'épiderme.

15 Suite au traitement des explants de peau par des produits selon l'invention correspondant respectivement à des fractions volumiques d'oligosaccharides ALGpH4 testées de 0,5 %, 2 % et 3,5 %, on a obtenu des effets immunoprotecteurs de 35 %, 64 % et 75 % (relation effet-dose).

20 On a par ailleurs procédé à une évaluation du potentiel phototoxique *in vivo* desdits produits selon un premier mode de réalisation de l'invention. Pour ce faire, on a sélectionné dix sujets âgés de 31 à 64 ans et ne présentant ni affection cutanée, ni antécédent médical susceptible de déconseiller l'application topique de substances.

25 On leur a appliqué sur un bras et pendant 24 heures un pansement adhésif occlusif contenant environ 0,2 ml de produit selon l'invention, puis on a irradié aux UVA leur bras dépourvu dudit pansement.

Il s'est avéré que ledit produit n'a pas induit de réaction de phototoxicité du type érythème ou oedème.

On a également procédé à deux tests *in vivo* qui sont généralement prévus pour permettre d'établir l'effet apaisant éventuel d'un produit.

5 - Le premier test est connu sous le nom de dosage du taux d'interleukine 1 α épidermique, après traitement topique. Il consiste à réaliser les opérations suivantes.

Le premier jour (J_0), des volontaires (10 volontaires sains d'âge moyen 27 dans cet exemple de réalisation) ont été sélectionnés

10 Un produit selon ledit premier mode leur a été appliqué sur les avant-bras (à raison de 2 μ l/cm²) à t_0 (initialement) et t_{12} (12 heures plus tard). Le lendemain (J_1), l'interleukine 1 α a été prélevée sur une zone traitée (ZT) et sur une autre zone non traitée (ZNT). Le taux d'interleukine 1 α a été dosé par la technique ELISA, en utilisant un anticorps monoclonal spécifique de l'interleukine 1 α et un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase. A la fin de la réaction substrat-peroxydase, la lecture du dosage est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques.

15 En théorie, on sait que plus la densité optique mesurée est forte, plus la concentration en interleukine 1 α est importante. Une augmentation de la concentration en interleukine 1 α épidermique traduit un effet apaisant du produit.

20 Les valeurs du taux d'interleukine 1 α et l'écart-type à la moyenne (SEM), obtenus sur les 10 volontaires, ont été calculés pour la zone traitée et pour la zone non traitée correspondante.

On a exprimé la variation sur les moyennes (Δ %) en appliquant la formule suivante:

$$\Delta \% = (ZT - ZNT) / ZNT \times 100.$$

25 Les données des 2 traitements (zone témoin et zone traitée) ont été analysés par un test de Student sur données appariées. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous:

| | Zone non traitée témoin | Zone traitée par oligoalginate de DP \approx 10 à 5 % (v/v) |
|--|-------------------------|---|
| Taux en pg/ml d'interleukine 1 α moyen \pm SEM (n = 10 personnes) | 84 \pm 10 | 93 \pm 9 |
| Δ (traité-témoin) | | 11,1 % |
| probabilité erreur | | 0,02 |

Ce test a montré que, après deux applications standards sur les avants bras espacées de 12 heures, ledit produit à 5 % augmente significativement le taux d'interleukine 1 α épidermique (Δ % = +11,1 %). On notera par ailleurs que la probabilité d'erreur de ce test est inférieure à 0,05, ce qui permet de valider ledit test.

Dans ces conditions expérimentales, ledit produit selon l'invention peut être considéré comme un produit apaisant.

- Le second test est connu sous le nom de Stinging Test.

Il s'agit d'un test "anti-picotement à l'acide lactique" qui a porté sur 8 volontaires après 28 jours d'utilisation biquotidienne de produits selon l'invention, caractérisés par une fraction volumique de 5 % dans une base cosmétique.

Ce test permet, dans un premier temps, d'évaluer la réactivité cutanée des volontaires inclus dans l'étude puis, dans un deuxième temps, d'évaluer l'effet anti-picotement du produit testé.

Le premier jour (J_0), un Stinging Test est effectué afin d'évaluer la réactivité de la peau au niveau du visage. Le produit a été distribué aux 8 volontaires retenus, lesquels se sont appliqués sur le visage ledit produit matin et soir, pendant lesdits 28 jours.

Conformément à ce test, chaque volontaire a procédé à une application sur son sillon naso-génien d'une solution d'acide lactique à 10 % sur l'un de ses côtés, et d'eau distillée sur son autre côté.

10 secondes, 2,5 minutes et 5 minutes après l'application, les sensations des volontaires sont évaluées selon l'échelle suivante:

- 0 : pas de picotement
- 1 : sensation légère

- 2 : sensation modérée

- 3 : sensation sévère

Un score global de réactivité prenant en compte les trois dates précitées a été calculé selon la formule:

5 score global = somme scores (acide lactique) - somme scores (eau distillée).

Après ces 28 jours (J_{28}), un nouveau Stinging test a été effectué de la même manière, avec les mêmes calculs de scores de réactivité.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

10 Scores de réactivité obtenus avant et après 28 jours de traitement (valeurs individuelles):

| Volontaire | J_0 | J_{28} | $J_{28} - J_0$ |
|------------|-------|----------|----------------|
| 1 | 4 | 2 | -2 |
| 2 | 3 | 2 | -1 |
| 3 | 5 | 4 | -1 |
| 4 | 4 | 1 | -3 |
| 5 | 3 | 3 | 0 |
| 6 | 4 | 3 | -1 |
| 7 | 6 | 5 | -1 |
| 8 | 4 | 1 | -3 |
| Moyenne | 4,1 | 2,6 | -1,5 |

15 Plus l'écart entre J_0 et J_{28} est important (avec $J_0 < J_{28}$), plus le seuil de réactivité est diminué.

Les scores moyens de réactivité obtenus pour l'ensemble des volontaires ont été de 4,1 à J_0 et de 2,6 à J_{28} , soit une diminution de 36,6 %.

20 Dans les conditions de l'étude, une application quotidienne dudit produit selon l'invention inclus à 5 % dans une base cosmétique a eu pour effet de diminuer le seuil de réactivité de la peau. Un effet anti-picotement dudit produit a été ainsi mis en évidence.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, un produit selon l'invention est obtenu en ajoutant à un produit selon ledit premier mode de réalisation (de préférence de degré de polymérisation voisin de 10), une solution comprenant un ou plusieurs oligo-éléments prévus pour former un complexe stable, encore appelé chélate, avec ledit produit. Lesdits oligo-éléments sont constitués d'éléments minéraux sous forme cationique.

A titre simplement indicatif, on trouvera ci-dessous deux exemples de préparation de chélates constituant des produits selon l'invention.

10

Exemple 1:

On resolubilise à 30°C (pH = 4,13) des extraits d'oligoalginates du type précité dans ledit premier mode. Puis, à une température de 20°C, on réajuste le pH desdits extraits à 5,60 avec de la soude 1N. Après centrifugation pendant 20 minutes à 8000 t/min, on mélange 100 grammes de fraction surnageante à une solution contenant des minéraux comprenant des ions zinc.

A titre d'exemple, on utilise 8 ml d'eau ultra pure contenant 0,5789 g de sulfate de zinc ($Zn SO_4, H_2O$) pour la réalisation dudit chélate.

20

Exemple 2:

Dans cet exemple, lesdites étapes de resolubilisation, de réajustement du pH et de centrifugation sont identiques. Seule diffère la solution minérale ajoutée.

Cette solution comprend un mélange d'ions magnésium et manganèse, dans les proportions suivantes:

on utilise 6 ml d'eau ultra pure contenant 2,652 g de sulfate de magnésium ($MgSO_4, 7H_2O$) + 10 ml d'eau ultra pure contenant 1,807 g de sulfate de manganèse ($MnSO_4, H_2O$) pour la réalisation dudit chélate.

On agite le mélange obtenu pendant 1 heure à température ambiante, puis on le centrifuge pendant 20 minutes à 8000 t/min.

On conserve ensuite la fraction surnageante contenant le chélate à température ambiante.

On va détailler ci-dessous l'activité supplémentaire que présente un chélate selon ledit premier exemple de préparation (chélate oligosaccharides-Zinc), en plus des effets précités obtenus pour un produit selon ledit premier mode de réalisation. Deux tests *in vitro* ont établi un effet anti-acné pour ce chélate.

5

- Premier test *in vitro* établissant un effet inhibiteur dudit chélate sur l'enzyme 5 α réductase:

On sait que les enzymes de type 5 α réductase (5 α R) transforment la testostérone en 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one ou 5-déhydrotestostérone (5DHT). Cette réaction est cruciale dans l'action des androgènes. Ces enzymes sont présentes dans les kératinocytes de l'épiderme, dans les fibroblastes du derme et dans les glandes sébacées, notamment.

L'effet inhibiteur du chélate oligosaccharide-Zn a été évalué par une méthode radiochimique, sur l'activité 5 α R d'un extrait de prostate de mammifère, tel qu'un chien. Dans cette expérience, en présence de NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et d'un système de régénération du NADPH, on assiste essentiellement aux réactions suivantes:



avec * = isomères 3 β , 17 β -diol et 3 α , 17 β -diol
et ** = 3-hydroxystéroïde deshydrogénases.

25

Matériel et méthode:

les solutions du produit ont été réalisées à 5 fois la concentration finale utilisée dans la réaction, dans un tampon citrate-phosphate à 0,1 M et à pH = 5,6 (tampon utilisé lors de la réaction 5 α R). L'inhibiteur de référence de 5 α R était le finastéride (Chibro-Proscar®, comprimés à 5 mg), testé à la concentration de 500 μ g/ml, après dilution dans le tampon citrate-phosphate à 0,1M.

30

L'extrait enzymatique utilisé était un extrait brut de prostate de chien préparé en tampon Tris 0,1 M/ sucrose 20 %, pH = 7,5. L'échantillon était calibré de façon à transformer approximativement 0,1 pmole de testostérone, avec 50 μ l d'extrait (soit une unité arbitraire d'enzyme).

Les mélanges ont été incubés pendant 4 heures à 37° C, puis la testostérone et les dérivés formés ont été extraits par 500µl de dichlorométhane. La fraction de dichlorométhane a été prélevée, séchée sous flux d'azote et chromatographiée sur silice dans un système dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol (proportions 5 85:15:3). Les plaques obtenues ont été autoradiographées sur films Kodak MP®.

L'évaluation de la quantité de testostérone transformée a été réalisée après découpage des spots de produits formés et comptage en scintillation liquide.

L'effet du finastéride et du chélate oligosaccharide-Zn sur la transformation de la testostérone en DHT et ASD est illustré dans le tableau ci-dessous.

10 (T = contrôles sans enzyme; E = contrôles plus enzyme; F = finastéride; P1 = oligosaccharides à 5 %; P2 = oligosaccharides à 1 %):

| n° | produit | conc (%) | cpm DHT | cpm ASD | cpm total | moyenne | moyenn e -T | activit é 5αR (%) | % inhibition |
|----|-------------|----------|---------|---------|-----------|---------|-------------|-------------------|--------------|
| T | - | - | 226 | 159 | 385 | 433 | 0 | 0 | |
| T | - | - | 330 | 153 | 483 | | | | |
| T | - | - | 264 | 167 | 431 | | | | |
| E | - | - | 939 | 3923 | 4862 | 4769 | 4336 | 100 | 0 |
| E | - | - | 779 | 4008 | 4787 | | | | |
| E | - | - | 929 | 3730 | 4659 | | | | |
| F | finastéride | 0,1 mM | 343 | 880 | 1223 | 1080 | 647 | 15 | 85 |
| F | | 0,1 mM | 262 | 748 | 1010 | | | | |
| F | | 0,1 mM | 359 | 647 | 1006 | | | | |
| P1 | chélate | 5 (%) | 626 | 2812 | 3400 | 3629 | 3196 | 74 | 26 |
| P1 | oligosacc | 5 (%) | 555 | 3235 | 3790 | | | | |
| P2 | harides- | 1 (%) | 786 | 3652 | 4438 | 4512 | 4079 | 94 | 6 |
| P2 | Zn | 1 (%) | 842 | 3732 | 4574 | | | | |
| P2 | | 1 (%) | 801 | 3724 | 4525 | | | | |

Résultats:

le finastéride inhibe de 85 % la transformation de testostérone en 5DHT et en ASD.

Le chélate oligosaccharide-Zn, testé à 1 % (v/v), n'a pas d'effet inhibiteur net. A 5% (v/v), il inhibe de 26 % l'activité de la 5 α réductase.

Conclusion:

Ce chélate oligosaccharide-Zn à 5 %(v/v) présente un effet inhibiteur intéressant sur l'activité de la 5 α réductase, d'où son effet intéressant contre l'acné.

10

- Second test *in vitro* établissant un effet sur la flore pathogène et non pathogène:

Les effets d'un oligosaccharide de degré de polymérisation voisin de 10 selon ledit premier mode et d'un chélate de cet oligosaccharide + Zn ont été évalués sur la souche non pathogène *Micrococcus kristinae*, la souche pathogène *Staphylococcus aureus* et la souche pathogène *Propionibactérieum acnes*. Cette dernière est particulièrement incriminée dans les irritations survenant au cours des infections cutanées de l'acné.

15

Matériel et méthode:

les bactéries sont cultivées dans un milieu salin (5,6 g/l de NaCl, 2,812 g/l de KH₂PO₄) contenant de la peptone pancréatique (5,625 g/l) et des extraits de cœur/cerveau (9,843 g/l). Les souches *M. kristinae* et *S. aureus* sont cultivées en milieu aérobie, et la souche *P. acnes* est cultivée en milieu anaérobie, soit en présence de 5 g/l de glucose (source carbonée classique), soit en présence d'un produit selon l'invention (oligosaccharide de degré de polymérisation voisin de 10 seul, ou cet oligosaccharide formant un chélate avec du zinc), soit en présence du seul milieu (cultures témoin). La quantité de bactéries ayant poussé est évaluée après 48 heures de culture par turbidimétrie à 750 nm.

25

Résultats:

le glucose à 5 g/l augmente d'un facteur 2,2; 1,6; et 5,2 la quantité de *M. kristinae*, *S. aureus* et *P. acne*, respectivement.

30

Ledit oligosaccharide de degré de polymérisation voisin de 10, testé à 5,6 % (v/v), n'a pas d'effet sur les 2 souches bactériennes *M. kristinae* et *S. aureus*. A cette concentration, il diminue de 14 ± 2 % (nombre de tests: n = 2) la quantité de *P. acnes*.

Le chélate oligosaccharide-Zn, testé à 5,6 % (v/v), augmente de 33 % *M. kristinae* (souche non pathogène), n'a pas d'effet sur *S. aureus*, et inhibe de 74 ± 12 % (nombre de tests: $n = 3$) la quantité de *P. acnes* (souche pathogène). A 1,6 %, il inhibe encore de 45 ± 15 % ($n = 2$) la souche *P. acnes*.

5 Conclusion:

au vu de ces résultats, la chélation du zinc augmente significativement l'effet inhibiteur de l'oligoalginate de degré de polymérisation voisin de 10 sur la souche pathogène *Propionibacterium acnes*, et favorise le développement de la souche non pathogène *Micrococcus kristinae*.

10 D'où son effet bénéfique vis-à-vis de l'acné.

On va à présent détailler ci-dessous l'activité supplémentaire que présente un chélate selon ledit second exemple de préparation (chélate oligosaccharides-Mg + Mn), en plus des effets précités obtenus pour un produit selon ledit premier mode de réalisation. Trois tests *in vitro* ont établi un effet anti-radicalaire pour ce chélate (les radicaux libres sont des radicaux créés par les rayonnements UV qui sont néfastes pour la peau).

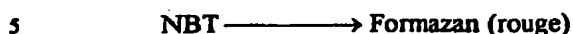
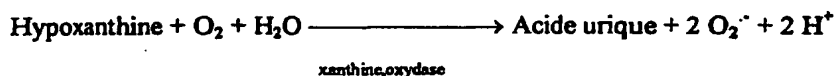
20 - Test de l'anion superoxyde:

Dans un premier temps, l'action anti-radicalaire d'un chélate oligosaccharide-Mg + Mn a été modélisé par le système hypoxanthine/xanthine oxydase, connu pour provoquer la formation d'un dérivé oxygéné fortement instable, l'anion superoxyde (O_2^-). Ce dernier génère une suite de réactions en cascade qui provoquent l'altération des protéines et des lipides cellulaires, mais aussi des acides nucléiques (ADN). Les effets ont été comparés à ceux de l'oligosaccharide non chélaté.

Matériel et méthode:

les anions superoxydes (O_2^-) ont été générés par l'addition de xanthine oxydase (55 mUI/ml) à de l'hypoxanthine (0,85 mM) dans un milieu Tris-HCl, pH = 7,4. Les anions superoxydes ont été quantifiés par la formation de formazan (rouge) à partir de nitrobleu de tétrazolium (NBT) à 33 μ M, par dosage spectrophotométrique en cinétique à 560 nm.

Le principe du dosage des anions superoxydes est le suivant:



Résultats:

l'oligosaccharide non chélaté inhibe de façon proportionnelle à sa concentration la réaction colorimétrique. Il exerce une activité anti-radicalaire vis-à-vis de l'anion superoxyde.

Le chélate oligosaccharide-Mg+Mn testé à 0,00001; 0,0001; 0,001 et 0,1 % (V/V) inhibe la réaction de 12 %, 28 %, 61 % et 75 %, respectivement.

A 0,33 % et 3,3 % (V/V), ledit chélate inhibe la réaction de 81 % et 92 %, respectivement.

Conclusion:

la complexation de Mg^{2+} et Mn^{2+} donne à l'oligoalginat des propriétés anti-radicalaires très puissantes vis-à-vis de l'anion superoxyde.

- Test sur la protection des protéines cellulaires:

L'effet anti-radicalaire vis-à-vis de l'anion superoxyde nous a amené à tester les effets du complexe oligosaccharide - Mg + Mn sur des cultures de fibroblastes de derme humain, soumises à une attaque proradicalaire provoquée par une irradiation aux rayons UV.

Matériel et méthode:

des fibroblastes de derme humain sont incubés pendant 24 heures avec les chélates d'oligosaccharides - Mg + Mn, aux 3 concentrations non cytotoxiques de 0,04; 0,2 et 1 % (v/v). Une série des cultures est exposée aux UV (0,325J/cm²), l'autre série est maintenue à l'abri de l'irradiation. Les protéines sont extraites et leur taux d'oxydation est mesuré par un dosage immunologique. L'oxydation des protéines introduit un groupement carbonyle au niveau de certains acides aminés (Lys, Arg, Pro, Thr). Les groupements carbonyles sont transformés en 2,4 dinitrophényl

hydrazone (DNP-hydrazone) et ces derniers dérivés sont quantifiés en utilisant un anticorps spécifique anti-DNP suivi d'une réaction colorimétrique.

Les résultats obtenus quant à l'effet protecteur desdits chélates vis-à-vis de l'oxydation desdites protéines sont présentés dans le tableau ci-dessous (par convention, le pourcentage de protection est considéré égal à 100 lorsque la quantité moyenne est inférieure ou égale à celle du témoin non irradié).

| Série d'échantillon | Quantité moyenne de groupement carbonyle dans les protéines \pm SEM | Pourcentage du témoin irradié | Pourcentage de protection |
|---|---|-------------------------------|---------------------------|
| Témoin non irradié | $0,46 \pm 0,25$ | 46 | 100 |
| Témoin irradié | $1,11 \pm 0,08$ | 100 | 0 |
| Traité par les chélates à 0,04 % puis irradié | $0,87 \pm 0,27$ | 78 | 37 |
| Traité par les chélates à 0,2 % puis irradié | $0,59 \pm 0,05$ | 53 | 80 |
| Traité par les chélates à 1 % puis irradié | $0,35 \pm 0,07$ | 31 | 100 |

10

L'irradiation UV augmente l'oxydation des protéines d'un facteur 2,4. Le chélate d'oligosaccharides - Mg + Mn diminue l'oxydation des protéines cellulaires provoquée par les rayons UV, avec un effet qui suit une relation dose-effet.

Conclusion:

15

Ce chélate protège les protéines cellulaires d'une attaque proradicalaire des rayons UV.

- Test sur l'effet protecteur de l'ADN cellulaire:

Des effets de protection de l'ADN ont été évalués en mesurant le taux de cassures de l'ADN dans des fibroblastes exposés à une irradiation UVB.

20

Matériel et méthode:

Des fibroblastes de derme humain (prélevés chez 5 donneurs) ont été incubés pendant 24 heures à 37° C en présence du chélate oligosaccharide-Mg + Mn, ou en présence de mélange constitué de vitamine C à 50µg/ml et de glutathion à 50µg/ml,

ou en présence de milieu sel (témoin). Une série des cultures a été exposée à une irradiation UVB (325 mJ/cm²), alors qu'une autre série a été maintenue à l'abri de l'irradiation.

5 Ces deux séries ont été placées à 37° C pendant 24 heures. Le taux de cassure de l'ADN a été évalué par le marquage des extrémités de l'ADN cassé avec un nucléotide couplé à la fluorescence (méthode TUNEL).

Cette méthode utilise l'enzyme Terminal Deoxynucleotidyl Transférase (TdT). Selon cette méthode, une diminution de la fluorescence des cellules traduit une diminution du nombre de cassures de l'ADN, c'est-à-dire un effet protecteur.

10 Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| | Cellules non irradiées | | Cellules irradiées | |
|---|------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | t ₀ | t ₂₄ | t ₀ | t ₂₄ |
| Témoin sans produit | +/- | +/- | + | +++ |
| Oligoalginate-Mg+Mn à 0,04 % (v/v) | +/- | +/- | + | + |
| Vitamine C à 50 µg/ml + glutathion à 50 µg/ml | +/- | +/- | + | + |
| Témoin sans TdT (contrôle négatif) | - | | | |
| Témoin sans TdT (contrôle positif) | > +++ | | | |

avec -: pas de fluorescence

+/-: faible intensité

+: intensité moyenne

+++ : forte intensité.

15

Commentaires des résultats:

20

En l'absence de l'enzyme TdT, les cellules ne sont pas fluorescentes. En présence de l'enzyme TdT et d'une enzyme qui dégrade l'ADN (Dnase I), on observe une très forte fluorescence. Par conséquent, la spécificité du marquage est établie.

En l'absence de rayonnement UVB et en présence de l'enzyme TdT, les cellules sont très peu fluorescentes. Après irradiation aux UVB et en présence de l'enzyme TdT, la fluorescence des cellules augmente.

Les cellules incubées en présence d'oligosaccharides-Mg+Mn à 0,04 %, (v/v) avant l'irradiation, puis irradiées, puis traitées avec l'enzyme TdT sont moins fluorescentes.

Conclusion:

L'oligosaccharide-Mg+Mn protège les fibroblastes dermiques de la cassure de l'ADN par les rayons UVB.

10

Selon une variante de réalisation dudit premier ou dudit second mode, un produit selon l'invention est constitué d'un premier produit, qui est obtenu conformément à l'un de ces deux modes, et d'un second produit, qui est élaboré à partir d'extraits naturels d'algues microscopiques du type *chlorella* selon le procédé suivant.

Ce procédé consiste essentiellement à effectuer un broyage en milieu alcalin desdites algues, à acidifier le jus d'extraction obtenu, à éliminer les débris cellulaires par microfiltration tangentielle sur un filtre dont le seuil de rétention est de 0,22 μ m, et à concentrer les éléments organiques restants, jusqu'à obtention d'un extrait comprenant 5 % de matières actives, qui constitue ledit second produit.

Le mélange desdits premier et second produits s'effectue dans un solvant neutre, par exemple de l'eau, en utilisant des concentrations de 5 % pour chacun d'eux.

25

ANNEXE

5 I. Détermination du degré de polymérisation moyen en nombre d'un extrait d'alginate de sodium dépolymérisé par un traitement à l'alginate lyase, par dosage des doubles liaisons conjuguées:

10 L'alginate lyase est une enzyme qui dépolymérise l'extrait d'alginate de sodium en générant des doubles liaisons conjuguées et des fonctions hémi-acétaliques réductrices.

15 Ces doubles liaisons conjuguées présentant un maximum d'absorption dans l'ultraviolet à 235 nm, on procède à leur dosage par spectrophotométrie ultraviolette, de manière à pouvoir quantifier le nombre de moles d'oligo-alginates produites dans le volume de solution.

20 On prélève une quantité donnée de milieu réactionnel à des moments différents de la réaction enzymatique, et l'on procède à l'ajustement du pH de la solution prélevée afin de ralentir ladite réaction. Dans cet exemple de réalisation, chaque prélèvement de milieu réactionnel est caractérisé, d'une part, par une masse de 10 g et un pH ajusté à 4 avec de l'acide chlorhydrique de concentration 1 N.

 De plus, ladite solution prélevée est diluée pour que sa densité optique soit inférieure à 1.

25 On mesure la densité optique (DO) de ladite solution pour un rayonnement de 235 nm, ce qui permet de doser la concentration C_{liaisons} (mol. l⁻¹) des doubles liaisons conjuguées, grâce à la relation:

$$(i) \quad C_{\text{liaisons}} = \frac{DO}{\epsilon},$$

30

 où ϵ (5050 l. mol⁻¹. cm⁻¹) représente le coefficient d'extinction moléculaire des oligo-alginates insaturés.

35 En tenant compte des dilutions pratiquées, il est possible de mesurer la concentration en doubles liaisons conjuguées dans le milieu réactionnel de départ. De plus, connaissant la concentration pondérale d'alginate C_{alginate} dans la solution (en

g. l⁻¹), on obtient la masse molaire moyenne en nombre M_n (g. mol⁻¹) des échantillons prélevés au moyen de la relation

$$(ii) \quad M_n = \frac{C_{\text{alginate}}}{C_{\text{liaisons}}}.$$

On en déduit le degré de polymérisation moyen en nombre DP_n au moyen de la relation suivante:

$$(iii) \quad DP_n = \frac{M_n}{M_0},$$

où M_0 désigne la masse molaire d'une unité constitutive de la molécule d'alginate de sodium ($M_0 = 216$ g. mol⁻¹).

II. Détermination du degré de polymérisation moyen en nombre d'un extrait d'alginate de sodium dépolymérisé au moyen d'une hydrolyse en milieu acide, par la méthode du dosage des sucres réducteurs (méthode dite de SOMOGYI-NELSON):

L'hydrolyse acide de l'alginate génère une fonction hémi-acétalique réductrice et une fonction hydroxyle. On procède au dosage de ladite fonction réductrice au moyen des solutions suivantes:

Solution A:

Carbonate de sodium anhydre: 25g.

Tartrate de sodium et de potassium: 25g.

Hydrogénocarbonate de sodium: 20g.

Sulfate de sodium anhydre: 200g.

On dissout ces quatre composés dans 1 l d'eau ultra-pure.

Solution B:

Sulfate de cuivre monohydraté: 30 g.

Acide sulfurique concentré: 4 gouttes.

On dissout l'ensemble dans 200 ml d'eau ultra-pure.

Solution C:

Obtenue par l'adjonction de 25 volumes de la solution A à un volume de la
5 solution B.

Solution D:

Molybdate ammoniacal: 25 g.

Acide sulfurique concentré: 39 g.

10 Arséniate de sodium: 3 g.

On dissout l'ensemble dans 500 ml d'eau ultra-pure.

Le principe de cette méthode repose sur le fait que ladite fonction hémi-
acétalique est oxydée par le cuivre et génère de l'oxyde cuivreux, lequel réagit avec le
15 complexe arsénio-molybdique pour produire un oxyde de molybdate.

Le mode opératoire suivi est décrit ci-dessous:

On ajoute 1 ml de la solution C à 1 ml de la solution à doser dans un tube à
essai, et l'on chauffe pendant 20 min au bain-marie le mélange obtenu. On refroidit
ensuite rapidement ledit mélange en versant de l'eau courante sur ledit tube. Puis on
20 ajoute successivement audit mélange 1 ml de solution D et 12 ml d'eau ultra-pure.

L'oxyde de molybdate produit présentant une absorption maximale pour un
rayonnement de longueur d'onde égale à 660 nm, on mesure la densité optique de la
solution obtenue à cette longueur d'onde.

Les calculs permettant de déterminer la masse molaire moyenne en nombre et
25 d'en déduire le degré de polymérisation moyen en nombre de l'alginate hydrolysé sont
les mêmes que ceux qui ont été exposés au Paragraphe I.

REVENDICATIONS

1) Procédé d'élaboration d'un produit destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau, caractérisé en ce qu'il consiste à utiliser un extrait naturel d'alginate de sodium et à soumettre ledit extrait à au moins un traitement de dépolymérisation.

5 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on soumet ledit extrait à un traitement de dépolymérisation enzymatique au moyen d'une alginatase.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que, ultérieurement audit traitement enzymatique, l'on soumet ledit extrait dépolymérisé à une hydrolyse en milieu acide.

10 4) Produit destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau, caractérisé en ce qu'il comprend des enchaînements d'oligo-alginates et d'acides uroniques.

5) Produit destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un oligoélément sous forme cationique formant un chélate avec lesdits enchaînements.

15 6) Produit destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit chélate comprend des ions Zn^{2+} .

7) Produit destiné à prévenir et à soigner des maladies de la peau selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit chélate comprend des ions Mn^{2+} et Mg^{2+} .

20 8) Produit selon une des revendications 4 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des extraits naturels d'algues du type *chlorella*.

9) Produit selon une des revendications 4 à 8, caractérisé en ce qu'il est prévu pour protéger des rayonnements ultraviolets les cellules de Langerhans de l'épiderme.

10) Produit selon une des revendications 4 à 8, caractérisé en ce qu'il est prévu pour augmenter la concentration épidermique de l'interleukine 1α .

25 11) Produit selon une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'il est prévu pour présenter un effet anti-radicalaire vis-à-vis des radicaux libres produits par des rayonnements ultraviolets.

12) Produit selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est prévu pour protéger les cellules du derme de l'oxydation des protéines.

30 13) Produit selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est prévu pour protéger les cellules du derme de la fragmentation de l'ADN.

14) Produit selon une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'il est prévu pour présenter un effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité de l'enzyme 5 α réductase.

5 15) Produit selon une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'il est prévu pour présenter un effet inhibiteur vis-à-vis de la souche bactérienne pathogène *Propionibactérium acnes*.